云 南 植 物 研 究 2001，23（4）：439～443
Acta Botanica Yunnanica

国产“水山姜”的分类学研究——来自核糖体 DNA ITS 区序列的证据*

赵志礼[1]，周开亚[2]，董 辉[1]，徐珞珊[1]
（1 中国药科大学生药学研究室，江苏 南京 210038；2 南京师范大学遗传资源研究所，江苏 南京 210097）

摘要：用直接测序法对国产黑果山姜 *Alpinia nigra*（Gaertn.）Burtt 以及“水山姜 *Alpinia aquatica*（Koen.）Rosc.”的核糖体 DNA 中的内转录间隔区（ITS）序列进行了测定，结果显示两者序列完全一致；ITS 1 长度为 178 bp，ITS 2 长度为 232 bp，5.8S 编码区长度为 164 bp，GC 含量为 56.9%。形态学特征结合 DNA 分子证据，认为《中国植物志》记载的水山姜实为黑果山姜。
关键词：核糖体 DNA；ITS 序列；黑果山姜；水山姜；分类学研究
中图分类号：Q 949，Q 75 文献标识码：A 文章编号：0253－2700(2001)04－0439－05

Studies on Systematics of“ *Alpinia aquatica* ”from China: Evidence from ITS Sequences of Nuclear Ribosomal DNA

ZHAO Zhi－Li[1]，ZHOU Kai－Ya[2]，DONG Hui[1]，XU Luo－Shan[1]
（1 *China Pharmaceutical University*，Nanjing 210038，China；2 *Nanjing Normal University*，Nanjing 210097，China）

Abstract: Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer（ITS） regions of *Alpinia nigra*（Gaertn.） Burtt and“ *Alpinia aquatica*（Koen.） Rosc.”from China were directly sequenced using an automated sequencer. The result showed that both sequences were identical. The size is 178 bp in ITS 1，232 bp in ITS 2 and 164 bp in 5.8S coding region，G＋C content being 56.9%. According to the morphological and DNA characters，it was suggested that“ *Alpinia aquatica*（Koen.） Rosc.”recorded in Flora of China should be *Alpinia nigra*（Gaertn.） Burtt.
Key words: nrDNA；ITS sequence；*Alpinia nigra*；*Alpinia aquatica*；Systematics

尽管《中国植物志》记载水山姜 *A. aquatica*（Koen.）Rosc. 在我国云南沧源、盈江有分布，并附该植物详图以供鉴别之用（吴德邻，1981），但有关中国大陆是否产此植物，仍然存在着不同看法（Smith，1990）。我们在对国产山姜属植物进行分类学研究中，查阅了国内有关馆藏标本，未见到采自我国的水山姜；而注意到被订为“水山姜”的标本，在形态特征上非常接近黑果山姜 *A. nigra*（Gaertn.）Burtt，如果实均为黑色，花冠后方裂片有钻状突起等。这些植物的分类位置究竟如何，难以最后确定。

近年来，分子系统学的飞速发展为解决植物系统学中的许多疑难问题以及确定一些分

* 基金项目：国家自然科学基金资助项目（39600010）及江苏省资源生物技术重点实验室资助项目
收稿日期：2000－08－09，2000－12－28 接受发表
作者简介：赵志礼（1956－）男，甘肃人，博士，副教授，从事中药鉴定及天然产物的活性筛选的研究。

类群的系统位置提供了有力证据。而核糖体DNA中的内转录间隔区（ITS）序列是核基因组中常见的1个DNA片段，其在被子植物系统学中的价值人们已有一定认识（Baldwin等，1995）。为此，我们选定广州华南植物园栽培多年的水山姜（为《中国植物志》论及的水山姜 *A. aquatica*（Koen.）Rosc.）及国产山姜属其它18个分类群的nrDNA ITS区序列进行了测定，以期为探讨山姜属内的系统发育关系并解决一些类群如“水山姜”等的系统位置提供分子系统学佐证。

1 材料与方法

1.1 材料来源

用于提取DNA的材料为新鲜叶片，原植物均经作者鉴定其学名；凭证标本藏于中国药科大学药用植物标本馆（CPU）；详细情况见表1。

表1 实验材料来源及凭证标本

Table 1 The origin of materials in the study and vouchers

taxon	locality	voucher
水山姜 *Alpinia aquatica*	华南植物园栽培	赵志礼 98022
黑果山姜 *Alpinia nigra*	云南景洪市嘎洒区	乔春峰 无 号

1.2 总DNA提取

参考Doyle & Doyle（1987）的总DNA提取方法，并加以改进，具体步骤如下：取适量新鲜叶片，经液氮研磨后，加入DNA提取缓冲液（8 mol/L Urea，0.35 mol/L NaCl，0.05 mol/L Tris-HCl（pH 8.0），0.02 mol/L EDTA，2% Sucrose，5%饱和酚，2% SDS），混匀，60℃水浴保温10 min；再加入2/5体积的饱和酚，3/5体积的氯仿-异戊醇（24∶1）混合液，轻轻摇匀后，60℃水浴保温15 min，离心；取上清液，加入等体积的氯仿-异戊醇（24∶1）混合液，混匀，离心；取上清液，用2倍体积的无水乙醇沉淀DNA，离心之后，倾出液体，将沉淀物用70%乙醇洗涤3~5次，风干，加入80~160 μL ddH_2O 重悬DNA；于4℃静置12 h以上，再次离心；最后，弃去沉淀物，上清液-20℃保存备用。

1.3 ITS区片段的PCR扩增与产物纯化

PCR扩增的引物为P1（5′-CGT，AAC，AAG，GTT，TCC，GTA，GGT，GAA，C-3′）、P2（5′-TTA，TTG，ATA，TGC，TTA，AAC，TCA，GCG，GG-3′），以扩增3′-18S-ITS-5′-26S（包括5.8S编码区）片段。反应体积为30 μL，其中含10×PCR buffer 3 μL，$MgCl_2$（25 mmol/L）2 μL，dNTP mix（2 mmol/L）2 μL，Primer1（10 μmol/L）1 μL，Primer 2（10 μmol/L）1 μL，Taq DNA polymerase（5U/μL）0.2~0.25 μL，Template DNA约70~80 ng，ddH_2O 适量。反应在GeneAmp PCR System 2400（PERKIN ELMER公司）上进行，条件为①95℃预变性4 min，②95℃变性1 min，③ 52~62℃复性45 s，④72℃延伸2 min，⑤重复②~④步骤共32个循环，⑥循环完成后，72℃保温3 min，反应结束；产物置4℃保存。

PCR扩增产物用Wizard™ PCR Preps DNA Purification System（Promega公司）进行纯化。

1.4 测序反应与ITS区序列的获得

将纯化后的PCR产物作为测序反应的模板，所用引物不仅使用P1、P2，而且从序列

中间（5.8S）插入 P3（5′－GCT，ACG，TTC，TTC，ATC，GAT－3′）或 P4（5′－CCA，TCG，AGT，CTT，TGA，ACG，CAA －3′），以确保所测序列的准确与完整。测序反应条件为①95℃变性 10 s，②50℃复性 5 s，③60℃延伸 4 min，④重复①～③步骤共 25 个循环，循环完成后，反应结束。其他操作均按 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer（PERKIN ELMER 公司）使用要求进行；毛细管电泳之后，序列资料直接从该测定仪上得到。

2 结果与讨论

对所获得的国产山姜属 19 个分类群 ITS 区序列进行分析比较后表明，该片段对山姜属种间有很好的分辨率；同种不同居群间则序列相一致（GenBank accession numbers：AF254458～AF254477）①。而对“水山姜”与黑果山姜的序列分析结果显示，两者完全一致：ITS 1 长度为 178 bp，ITS 2 长度为 232 bp，5.8S 编码区长度为 164 bp，GC 含量为 56.9%（图 1）。因此，在解决“水山姜”的分类学问题上，“水山姜”与黑果山姜的序列资料有力地支持了我们的形态学研究结果。

黑果山姜具漏斗状小苞片，宿存；唇瓣倒卵形或倒心形，深 2 裂；果实成熟后变为黑色；另一重要特征为：花冠后方裂片的顶端（背面）具钻状突起。该植物在我国的分布区很有限，仅产云南南部。而水山姜主产地在马来西亚，其苞片叶状，早落，小苞片亦早落；唇瓣方菱形，4 裂；果实黑色；花冠后方裂片决无钻状突起（Holttum，1950）。两种群特征明显，还是易于区别的。

我们在对采自广州华南植物园的“水山姜”（移自云南）进行的比较观察中注意到该植物唇瓣倒卵形，2 裂，几达中部；果实黑色；这些与《中国植物志》“水山姜”项下的记载一致；至于观察到的花冠后方裂片有钻状突起，长约 2.5 mm；小苞片叶状，内凹，对生的特征虽然没有给予文字上的描述，但从其水山姜的附图中可以清楚地看到。将这些特征与黑果山姜加以比较，除了小苞片形态不尽相同以外，其它非常吻合。ITS 区的序列资料亦提供了有力的证据：采自广州华南植物园的“水山姜”与采自云南西双版纳的黑果山姜，序列完全一致。黑果山姜与节鞭山姜 *A. conchigera* Griff. 同为黑果山姜亚属植物，“水山姜”被置于山姜亚属（吴德邻，1981）；就序列长度来看，黑果山姜亚属的两近缘种很接近，前者长度为 410 bp，后者 412 bp，而其它亚属的类群几乎皆在 405 bp 以下。形态学（除小苞片外）与分子系统学特征均很好的说明“水山姜”与黑果山姜为同一种群。但如何解释小苞片的形态差异呢？我们推测：①长期栽培引起的返祖现象，即由小苞片连合，漏斗状的次生性状发生了变化，出现小苞片分离，叶状，对生的较原始性状。这在同一植株的同一花序上便可以看到：有一些小苞片叶状，对生，完全分离；有一些则内凹，靠合，颇似漏斗状。②可能为黑果山姜种下等级的分化，但分化较晚，ITS 区序列尚未出现位点的变异。小苞片形态发生的变化，可能是导致将黑果山姜误订为水山姜的主要原因之一。另外，《中国植物志》在此两名称项下，均没有明确指出“花冠后方裂片的顶端（背面）具钻状突起”这一重要特征，是很遗憾的。

① The sequences determined in the paper are deposited in the GenBank database（accession numbers AF254458～AF254477）.

```
                18S                  ITS 1  > >
A. aquatica     CTGCGGAAGGATCATTGTCGAGAGAGCATCGAATGATGGATGATTGCGAACGTGTCAACG
A. nigra        CTGCGGAAGGATCATTGTCGAGAGAGCATCGAATGATGGATGATTGCGAACGTGTCAACG

A. aquatica     TGCTCCTTTCCTTGCCTCATGTTGCTGGGCAATCGATCGTAGCTCGGTGCGATCGGCACC
A. nigra        TGCTCCTTTCCTTGCCTCATGTTGCTGGGCAATCGATCGTAGCTCGGTGCGATCGGCACC

A. aquatica     AAGGAACAATGAACTCAGAAGCAGAGGGCCCTCGGCGTGCATGGGGAGCCCAATGCATCG
A. nigra        AAGGAACAATGAACTCAGAAGCAGAGGGCCCTCGGCGTGCATGGGGAGCCCAATGCATCG
                              5.8S
A. aquatica     AAGATGCCTCAGAATCAAATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAA
A. nigra        AAGATGCCTCAGAATCAAATGACTCTCGGCAATGGATATCTCGGCTCTTGCATCGATGAA

A. aquatica     GAACGTAGTGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCTCGTGAACCATTGAGTCTT
A. nigra        GAACGTAGTGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCTCGTGAACCATTGAGTCTT

A. aquatica     TGAACGCAAGTTGTGCCCGAGGCCTTGTGGTCGAGGGCACGCCTGCTTGGGCGTCATGGC
A. nigra        TGAACGCAAGTTGTGCCCGAGGCCTTGTGGTCGAGGGCACGCCTGCTTGGGCGTCATGGC
                ITS 2 > >
A. aquatica     ATCGTCGCCTTTGCTCCTTGCTTTGCCGCCGGTGCTAAGCGCGGAAATTGGCCTTGTGTG
A. nigra        ATCGTCGCCTTTGCTCCTTGCTTTGCCGCCGGTGCTAAGCGCGGAAATTGGCCTTGTGTG

A. aquatica     CCCTCGCCCGAGGGCACAGTCGGTCGAAGAGTGGGTAGTCGATAGTCGTCGGGCGCGATG
A. nigra        CCCTCGCCCGAGGGCACAGTCGGTCGAAGAGTGGGTAGTCGATAGTCGTCGGGCGCGATG

A. aquatica     GGTGTTGGTCGCCTCGTGCGTGAACTAAACGTCATCCCCGTCGTGCTGAGATGAGTCCTC
A. nigra        GGTGTTGGTCGCCTCGTGCGTGAACTAAACGTCATCCCCGTCGTGCTGAGATGAGTCCTC
                                                                  26S
A. aquatica     ATGAGACCTTTTGCGATTGCGATGTCAAGCGAAAGCGATGTCGGTCGGATTGTGGCCCCA
A. nigra        ATGAGACCTTTTGCGATTGCGATGTCAAGCGAAAGCGATGTCGGTCGGATTGTGGCCCCA

A. aquatica     AGTCAGGCGAGGCCCA
A. nigra        AGTCAGGCGAGGCCCA
```

图 1　国产“水山姜 *Alpinia aquatica*”与黑果山姜 *Alpinia nigra* 的 ITS 区序列，
阴影部分为 18S 3′端、26S 5′端的部分序列以及 5.8S 全序列

Fig.1　ITS sequences of“*Alpinia aquatica*”and *Alpinia nigra* from China. The 3′ end of the 18S coding region, the entire sequence of 5.8S coding region and 5′ end of the 26S coding region are bold – faced

目前尚未见到有关水山姜 *A*. *aquatica*（Koen.）Rosc. ITS区的序列资料；而从已发表的黑果山姜 *A*. *nigra*（Gaertn.）Burtt ITS1区与ITS2区序列（GenBank accession numbers：AF192729～AF192730）来看，与我们所获得的序列，ITS1区的长度两者相一致，变异位点21个，ITS2区长度相差2个碱基，变异位点40个。序列长度与黑果山姜亚属植物同源性较高，但出现一定的变异位点，我们考虑其原因之一可能是由于黑果山姜种下等级的分化。

形态学特征结合ITS区序列分析资料，我们认为《中国植物志》记载的“水山姜”与产自云南的黑果山姜为同一类群。

致谢　中国科学院华南植物研究所吴德邻先生，南京师范大学王义权教授、沈曦博士生以及中国药科大学李晓波博士后在工作中给予指导与帮助。

〔参 考 文 献〕

吴德邻，1981. 中国植物志第16卷2分册［M］. 北京：科学出版社，67—106

Baldwin B G，Sanderson M J，Porter J M *et al*，1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA：A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny［J］. *Ann Missouri Bot Gard*，**82**：247—277

Doyle J J，Doyle J L，1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue［J］. *Phytochem Bull*，**19**：11—15

Holttum R E，1950. The Zingiberaceae of the Malay Peninsula［J］. *Gard Bull Singapore*，**13**：159—160

Smith R M，1990. *Alpinia*（Zingiberaceae）：A proposed new infrageneric classification［J］. *Edinb J Bot*，**47**（1）：16—17